Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Histometrische Untersuchungen zu einer quantitativen Gonadotropinnachweismethode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dorothea Etzold, geb. Eisenhart
aus Tübingen

1969

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Histometrische Untersuchungen zu einer quantitativen Gonadotropinnachweismethode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dorothea Etzold, geb. Eisenhart
aus Tübingen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Dozent Dr. R. Blobel
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Roemer

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALTSANGABE

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Methodik	4
III.	Ergebnisse	8
IV.	Diskussion	10
V.	Zusammenfassung	16
VI.	Literaturverzeichnis	17

I. EINLEITUNG

Zur quantitativen Bestimmung der gonadotropen Hormone sind trotz Weiterentwicklung der immunologischen Teste die biologischen noch immer von Bedeutung. Von ihnen wird ganz allgemein gefordert, daß die zu bestimmende Strukturänderung spezifisch ist für das betreffende Hormon und daß eine Korrelation besteht zwischen der Menge der zugeführten hormonellen Aktivität und dem Ausmaß der Strukturänderung.

Die biologischen Nachweismethoden der gonadotropen Hormone beruhen auf meßbaren Veränderungen, die sich primär an den Gonaden und sekundär an den akzessorischen Organen (z.B. Uterus, Prostata, Samenblase) bemerkbar machen.

Es wurde versucht die FSH-Aktivität (Follikelstimulierendes Hormon) nachzuweisen, a) anhand der Größenzunahme der Ovarialfollikel und des Gewichtsanstieges der Ovarien infantiler oder hypophysektomierter Ratten und Mäuse (z.B. EVANS, SIMPSON, TOLKSDORF und JENSEN 1939; EVANS und SIMPSON 1950) und b) mit Hilfe der Hodengewichtszunahme hypophysektomierter Ratten (z.B. GREEP, van DYKE und CHOW 1940).

Es zeigte sich jedoch, daß bessere Ergebnisse bei der quantitativen Bestimmung der FSH-Aktivität erzielt werden, wenn gleichzeitig eine konstante Überdosis HCG (Choriongonadotropin) verabreicht wird. Dies beruht darauf, daß durch das HCG einerseits die Gonaden für FSH sensibilisiert werden, andererseits der fast immer vorhandene geringe Gehalt an ICSH-Aktivität (interstitielle Zellen stimulierendes Hormon) vernachlässigt werden kann. Auf diese Weise wurden folgende Nachweismethoden entwickelt: Bestimmung a) der Ovarialgewichtszunahme bei hypophysektomierten Ratten (BATES 1942), bei intakten infantilen Ratten (STEELMAN und POHLEY 1953) und bei infantilen Mäusen (BROWN 1956); b) der Uterusgewichtszunahme bei infantilen Mäusen (BROWN und BILLEWICZ 1962; IGARASHI und Mc CANN 1964); c) der Hodengewichtszunahme bei hypophysektomierten infantilen Ratten (PAESI, WIJNANS und de JONGH 1951; PAESI, de JONGH, HOOGSTRA und ENGELBRECHT 1955; BLOBEL 1966; GANS und van REES 1966). Auf Grund der Angaben von WOODS und SIMPSON (1961), die feststellten, daß neben ICSH auch Testosteron synergistisch mit FSH reagiert, wurde die zuletzt

genannte Methode von BLOBEL (1966) modifiziert, indem er an Stelle einer Überdosis HCG eine Überdosis Testosteronpropionat verabreichte.

Als Nachweis von ICSH-Aktivität und damit auch von HCG kann man betrachten: a) die Wiederherstellung der degenerierten interstitiellen Zellen in den Ovarien oder Hoden hypophysektomierter Ratten (EVANS, SIMPSON, TOLKSDORF und JENSEN 1939 und GREEP, van DYKE und CHOW 1942), b) die Ascorbinsäureabnahme in den Ovarien (PARLOW 1958), c) die Gewichtszunahme der ventralen Prostata und der Samenblase bei hypophysektomierten infantilen Ratten (GREEP, van DYKE und CHOW 1941). Als häufige Methode zur Bestimmung der gesamten gonadotropen Aktivität sowie des HCG wird die Uterusgewichtszunahme bei infantilen Mäusen verwendet.

Neben der Messung von Größe und Gewicht der Organe und der qualitativen Beurteilung des histologischen Bildes wurden auch histometrische Methoden herangezogen. So untersuchte MUSCHKE (1953) den Einfluß der Hypophysektomie und der HCG-Zufuhr auf den Hoden der Ratte quantitativ am Kernvolumen der Leydigzellen und am Durchmesser der Tubuli semniferi. HERCHEN (1954) prüfte die Wirkung einer ansteigenden HCG Dosierung an der Kern- und Plasmaentfaltung der Leydigzellen. Ähnliche Untersuchungen wurden von FETZER, HILLEBRECHT, MUSCHKE und TONUTTI (1955) an den interstitiellen Zellen des Rattenovars durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der gonadotropen Aktivität auf das histologische Bild des Rattenhodens quantitativ untersucht.

Die beiden Bauelemente des Hodens, die interstitiellen oder Leydigschen Zellen und die Tubuli semniferi, werden getrennt durch die gonadotropen Hormone beeinflußt. Das Wachstum und die Androgensekretion der interstitiellen Zellen wird spezifisch durch ICSH angeregt. Auch die nach der Hypophysektomie atrophierten Leydigzellen werden durch ICSH-Aktivität wieder stimuliert und zur Norm entfaltet.

Das Wachstum des Keimepithels und die Spermiogenese wird, wie man allgemein annimmt, durch FSH-Aktivität gesteuert. Nach der Hypophysektomie bleibt mit Hilfe von FSH das Keimepithel erhalten und wird bei schon eingetretener Atrophie wieder regeneriert. Eine Atrophie des Keimepithels kann man auch mit Androgen verhindern (z.B. WALSH, CUYLER und Mc CULLAGH 1934). HCG und ICSH-Aktivität zeigen die gleiche Wirkung, die, wie GREEP et al. (1942), WOODS und SIMPSON (1961) sowie TONUTTI (1955) vermuten, über das von den stimulierten Leydigzellen freigesetzte Androgen erfolgt. Einen Beweis für die Androgenabhängigkeit der Tubuli semniferi erbrachten

NEUMANN et al. (1966), indem sie eine Atrophie des Keimepithels mit Hilfe des Androgenantagonisten Cyproteronacetat hervorrufen konnten.

Sehr wahrscheinlich beruht die Wirkung des FSH auf die Tubuli semniferi auf einem synergistischen Effekt mit ICSH-Aktivität (bzw. Androgen), das in den gebräuchlichen FSH-Präparaten in geringer Menge enthalten ist. Bei der Verwendung eines FSH-Präparates, das keine ICSH-Aktivität zeigte, fanden WOODS und SIMPSON (1961) nur einen ganz geringen Einfluß auf die Erhaltung der Spermatogenese. Von BERSWORDT-WALLRABE, STEINBECK und NEUMANN (1968) konnten die Wirkungslosigkeit von reinem FSH bestätigen, indem sie die ICSH-Aktivität durch den Androgenantagonisten Cyproteronacetat ausschalteten.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hodenpräparate waren von BLOBEL (1966) für den FSH-Nachweis nach PAESI, WIJNANS und de JONGH (1951) und nach seiner eigenen modifizierten Methode sowie für den FSH-Nachweis im HCG nach eben diesem Verfahren verwendet worden. Anhand der Präparate sollte die Frage geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen der Hodengewichtszunahme (nach BLOBEL 1966) und dem Durchmesser der Tubuli semniferi und bzw. oder dem Kernvolumen der Leydigzellen besteht.

II. METHODIK

Zur Verfügung standen die in Paraffin eingebetteten Hoden von 85 Tieren aus den Versuchen von BLOBEL (1966), die folgendermaßen behandelt worden waren:

Die männlichen infantilen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 30 - 40 g wurden in Äthernarkose nach der parapharyngealen Methode hypophysektomiert und gleichzeitig unilateral orchidektomiert. Nach der Hypophysektomie wurden sie in einem Isolierraum bei 23° C gehalten. Futter: Altromin R und 5%ige wäßrige Glucoselösung. 24 Std. nach der Operation beginnend, wurden die Testlösungen zu je 1 ml subcutan (Testosteronpropionat i.m.) an 5 Tagen im Abstand von 24 Std. verabreicht. Der zweite Hoden wurde 24 Std. nach der letzten Injektion entnommen und nach Bestimmung der Gewichtsdifferenz gegenüber dem ersten Hoden in Bouinscher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet (BLOBEL 1966).

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden davon Schnitte von 5 µ Dicke angefertigt und mit der HOPA Färbung (Hämatoxylin-Orange G-Phosphormolybdänsäure- Anilinblau) nach TONUTTI gefärbt.

Färbegang:

1) Kernfärbung mit Hämalaun (6 - 8 min)
2) Wässern in Leitungswasser
3) 1%ige wäßrige Orange-G-Lösung (leicht mit Eisessig angesäuert) (5 min)
4) Spülen in Aqua dest.
5) 1%ige Anilinblaulösung in 1%iger wäßriger Phosphormolybdänsäure (ca. 5 min)
6) Nach kurzem Spülen in H_2O kurz differenzieren in 80%igem Alkohol und rasche Entwässerung.

Von jedem Hoden wurden bei 2000facher Vergrößerung mit Hilfe eines Zeichenprismas je 200 Kerne von Leydigzellen gezeichnet, und beide Durchmesser bis auf 1/2 mm genau gemessen. Daraus ließ sich das Kernvolumen nach der Formel

$$V = \frac{\pi}{6} AB^2$$

mittels eines Normogramms bestimmen (A großer, B kleiner Durchmesser).

Ebenso wurden von jedem Hoden 50 Tubulusquerschnitte gezeichnet, und der Durchmesser bis auf 1/2 mm genau bestimmt. Bei schräg getroffenen Tubuli wurde der kleinste Durchmesser berücksichtigt.

Aus diesen Werten wurde zunächst je Tier, dann je Versuchsgruppe, der Mittelwert errechnet. Für die Versuchsgruppen wurde der mittlere Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) nach folgender Formel bestimmt:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}} \qquad s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}{N - 1}}$$

x = Mittelwert je Tier

N = Zahl der Meßwerte

Ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuchsgruppen vorliegt, wurde mit Hilfe des t-Tests ermittelt (nach LEMBECK und SEWING 1966).

Die Hoden folgender Versuchsgruppen aus der Arbeit von BLOBEL (1966) wurden hier untersucht. Es sind jeweils die Gesamtmengen der Substanzen angegeben; sie wurden auf 5 Einzelinjektionen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen verteilt.

I. Als Vergleichskollektiv erhielten in

Versuchsgruppe 1: 5 Tiere physiologische Kochsalzlösung
Versuchsgruppe 2: 9 Tiere Choriongonadotropin 40 IE (HCG 065)
Versuchsgruppe 3: 9 Tiere Testosteronpropionat 2,5 mg (Perandren®)

II. Im Rahmen der quantitativen FSH-Teste wurden die Ratten folgendermaßen behandelt:

Versuchsgruppe 4: 7 Tiere mit 50 µg FSH (Standardpräparat des US-National-Institut of Health, NIH-FSH-S2),
8 Tiere mit 200 µg FSH, jeweils zusammen mit 2,5 mg Testosteron.

Versuchsgruppe 5: 6 Tiere mit 50 µg FSH und 8 Tiere mit 200 µg FSH zusammen mit jeweils 40 IE HCG.

III.

Versuchsgruppe 6: 33 Tieren wurde HCG in steigender Dosierung (200, 400, 800, 1600 IE) zusammen mit je 2,5 mg Testosteron-propionat als Nachweismethode für FSH-Aktivität im HCG verabreicht.

Es wurden außerdem die Hoden von 6 nicht hypophysektomierten Tieren untersucht.

Tab. I: Einfluß der Hormonpräparationen FSH (NIH-FSH-S2), HCG 065 und Testosteronpropionat in verschiedener Kombination und Dosierung auf den Hoden der hypophysektomierten unilateral orchidektomierten infantilen Ratte, gemessen an der Hodengewichtszunahme, dem Durchmesser der Tubuli semniferi und dem Kernvolumen der Leydigschen Zellen. (Es sind jeweils die Gesamtmengen angegeben; diese wurden auf 5 Einzelinjektionen verteilt)

Versuchs-gruppen	Zahl der Tiere	Hormon-dosierung			[1] Hodengewichts-zu/abnahme	Durchmesser der Tubuli semniferi	Kernvolumen der Leydigzellen
		FSH µg	HCG IE	Testo mg	mg	$\mu \pm s_{\bar{x}}$	$\mu^3 \pm s_{\bar{x}}$
Normaltiere	6	-	-	-	-	121,2 ± 1,67	61,0 ± 3,72
1	5	-	-	-	-40,4	85,5 ± 3,20	43,2 ± 3,50
2	9	-	40	-	-11,3	96,4 ± 0,60	97,7 ± 2,90
3	9	-	-	2,5	-17,4	105,6 ± 2,34	45,7 ± 2,38
4	7	50	-	2,5	8,8	112,3 ± 2,54	48,0 ± 2,00
	8	200	-	2,5	34,9	119,3 ± 4,03	40,3 ± 2,25
5	6	50	40	-	29,0	114,8 ± 3,88	96,2 ± 3,46
	8	200	40	-	49,0	115,3 ± 2,76	90,2 ± 2,12
6	8	-	200	2,5	-3,9	99,2 ± 1,75	92,2 ± 2,08
	8	-	400	2,5	-3,7	107,2 ± 2,76	88,4 ± 3,05
	8	-	800	2,5	7,4	104,9 ± 2,72	97,8 ± 3,82
	9	-	1600	2,5	17,4	105,3 ± 3,12	106,7 ± 2,80

1) Diese Werte wurden der Arbeit "Über das Choriongonadotropin" BLOBEL (1966) entnommen

III. ERGEBNISSE

Die Mittelwerte der Versuchsgruppen und die mittleren Fehler des Mittelwertes sind in Tabelle I angeführt.

1. Einfluß der Hormonpräparate auf den Durchmesser der Tubuli semniferi:

Die Normaltiere (intakte Tiere) zeigen mit 121 µ den größten Tubulusdurchmesser. Die Durchmesser der Versuchsgruppe 1 (unbehandelte hypophysektomierte Tiere) sind gegenüber den Normaltieren um 1/3 verkleinert und weisen mit 85 µ den kleinsten Wert aller Versuche auf. In Versuchsgruppe 2 (40 IE HCG) ist die Größenzunahme der Tubulusdurchmesser mit 96 µ gegenüber den unbehandelten Tieren signifikant. In Versuchsgruppe 3 (2,5 mg Testosteronpropionat) weisen die Tubuli einen Durchmesser von 105 µ auf, der signifikant größer ist als der von Versuchsgruppe 1 und 2. Ungefähr die gleiche Größe haben die Tubulusdurchmesser der Versuchsgruppe 6 (200, 400, 800, 1600 IE HCG plus Testosteron) nämlich 99, 107, 104 und 105 µ. Zwischen den einzelnen Dosierungen von HCG besteht kein signifikanter Unterschied in der Größenzunahme.

Dagegen sind die Hodentubuli der Versuchsgruppen 4 und 5 (50 und 200 µg FSH zusammen mit 40 IE HCG bzw. 2,5 mg Testosteron) signifikant größer als die aller übrigen Versuchsgruppen. Mit 112 - 119 µ erreichen sie ungefähr die Größe der nicht hypophysektomierten Normaltiere. Ein signifikanter Unterschied der Tubulusdurchmesser konnte weder bei einer Dosissteigerung von 50 auf 200 µg FSH, noch zwischen den Zusätzen HCG und Testosteron festgestellt werden.

2. Einfluß der Hormonpräparate auf das Kernvolumen der Leydigzellen:

Aus Tab. I geht hervor, daß die nicht hypophysektomierten Tiere ein Kernvolumen von 61 μ^3 haben. Sechs Tage nach der Hypophysektomie hat bei den unbehandelten Tieren (Versuchsgruppe 1) das Kernvolumen um etwa 1/3 abgenommen (43 μ^3). Annähernd das gleiche Kernvolumen (45, 48, 40 μ^3) zeigen die Tiere, die allein mit Testosteron (2,5 mg, Versuchsgruppe 3) oder mit 50 bzw. 200 µg FSH zusammen mit Testosteron (Versuchsgruppe 4) behandelt worden waren. Eine Gesamtdosis von 400 IE HCG sowohl allein (Versuchs-

gruppe 2) als auch mit FSH zusammen (Versuchsgruppe 5) stimuliert das Wachstum der Zellkerne auf das Doppelte der hypophysektomierten Kontrolltiere, nämlich auf 97, 96, 90 μ^3. In der Versuchsgruppe 6 (200 - 1600 IE HCG plus Testosteron) betragen die Kernvolumina 92, 88, 97 und 106 μ^3. Es besteht keine Größenzunahme zwischen den Versuchsgruppen mit 40 IE HCG und 200, 400, 800 IE HCG. Innerhalb der Versuchsgruppe 6 ist dagegen ein signifikanter Unterschied im Kernvolumen zwischen einer Dosierung von 400, 800 und 1600 IE HCG festzustellen. Das Kernvolumen von 106 μ^3 bei 1600 IE HCG ist gegenüber den anderen Werten deutlich erhöht. Im Vergleich zu den nicht hypophysektomierten Tieren ist es über 1/3 angewachsen.

Auf Grund subjektiver Beobachtungen, die jedoch quantitativ nicht ausgewertet wurden, scheint die Zahl der Leydigzellen in der Gruppe 6 mit steigender HCG Dosierung zuzunehmen.

IV. DISKUSSION

MUSCHKE (1953), dessen histometrische Methoden hier übernommen wurden, fand bei nicht hypophysektomierten Ratten mit einem Gewicht von 140 - 150 g einen Tubulusdurchmesser von 134 µ und ein Kernvolumen der Leydigzellen von 100 - 120 μ^3. Die Normaltiere der hier verwendeten infantilen Ratten mit einem Gewicht von 35 - 40 g zeigten mit einem Tubulusdurchmesser von 121 µ und einem Kernvolumen von 61 μ^3 entsprechend kleinere Werte.

Nach der Hypophysektomie waren die Tubuli und Zellkerne der unbehandelten Tiere innerhalb von 7 Tagen um etwa 1/3 gegenüber der Norm geschrumpft. Bei den Versuchstieren von MUSCHKE (1953) waren Hodentubuli und Zellkerne nach 4 Wochen um die Hälfte geschrumpft.

Das histologische Bild nach der Hypophysektomie entspricht dem Befund, wie ihn auch TONUTTI (1943) beschreibt: Die normalerweise rundlichen, bläschenförmigen Zellkerne mit feinverteiltem Chromatin sind nach der Hypophysektomie plump, oval, stark verkleinert und zeigen eine fleckförmige Anordnung des Chromatins ("Schachbrettmuster"). Das Protoplasma ist bis auf einen schmalen Saum geschwunden. Die Tubulusgröße nimmt nach der Hypophysektomie ab. Es bleibt eine 2 - 3schichtige Zellreihe bestehen, die von Sertolizellen, Spermatogonien und vereinzelt Spermatocyten I gebildet wird. Die Tunica propria erfährt eine fibröse Verdickung.

Einen deutlichen Effekt auf das Keimepithel zeigte Testosteronpropionat (2,5 mg, Versuchsgruppe 3). Es verhinderte bis zu einem gewissen Grad die Atrophie der Tubuli semniferi nach Hypophysektomie, die signifikant größer sind als die der unbehandelten Kontrolltiere. Diese stimulierende Wirkung von Androgen wird mehrfach in der Literatur beschrieben. So vermag Androgen nach der Hypophysektomie die Spermiogenese zu erhalten (WALSH et al. 1934) und selbst völlig atrophische Tubuli wieder zu regenerieren (BOCCABELLA 1963). Eine normale Spermiogenese sei durch Androgen aber nicht zu erzielen (TONUTTI 1960).
Auf die Leydigzellen war Testosteron, wie zu erwarten, ohne Wirkung.

Eine Behandlung mit 40 IE HCG (Versuchsgruppe 2) verhinderte die Atrophie der Leydigzellen vollkommen, es stimulierte sie sogar über das normale Maß

hinaus. Die Kernvolumina zeigten die 1 1/2fache Größe der Normaltiere; sie waren mehr als doppelt so groß wie die der hypophysektomierten Kontrolltiere. Auf den Tubulusdurchmesser hatten 40 IE HCG einen signifikanten Einfluß. Die Wirkung war geringer als die von 2,5 mg Testosteron (Versuchsgruppe 3).

Die Stimulierung der Leydigzellen und die teilweise Erhaltung der Spermatogenese durch HCG nach Hypophysektomie wird vielfach in der Literatur beschrieben (z.B GREEP et al. 1942; MUSCHKE 1953; TONUTTI 1955; NEUMANN et al. 1968). Dabei soll HCG über die Bildung von Androgen auf die Tubuli wirken, was NEUMANN et al. (1968) mit Hilfe des Androgenantagonisten Cyproteronacetat bestätigen konnten. TONUTTI spricht von einer androgenen Kontaktwirkung der stimulierten Leydigzellen auf die Tubuli semniferi, im Gegensatz zur androgenen Fernwirkung auf Prostata und Samenblase.

In Versuchsgruppe 6 (200 - 1600 IE HCG zusammen mit 2,5 mg Testosteron) ließ HCG gegenüber der relativ hohen Testosterondosierung keinen zusätzlichen Einfluß auf den Durchmesser der Tubuli semniferi erkennen. Die durch Testosteron maximal mögliche Stimulierung des Keimepithels ist offensichtlich schon bei 2,5 mg Testosteronpropionat erreicht (Versuchsgruppe 3).

Während eine Dosierung von 40 IE HCG (Versuchsgruppe 2) bereits eine Erhöhung des Kernvolumens der Leydigzellen auf 97 μ^3 bewirkt (s.o.), war bei einer Dosierung von 200 - 800 IE HCG mit jeweils 2,5 mg Testosteron kein weiterer Effekt festzustellen (Versuchsgruppe 6). Ein signifikanter Unterschied ist lediglich bei einer Dosierung von 1600 IE HCG plus Testosteron zu verzeichnen. Nach TONUTTI (1955) ist der Differenzierungsgrad der Leydigzellen, gemessen am Kernvolumen, in gewissem Umfang ein brauchbares Maß für die zugeführte ICSH-Aktivität. HERCHEN (1954) fand mit steigender HCG Dosierung eine deutliche Zunahme des Plasmas der Leydigzellen. In einem Dosisbereich von 0,5 - 2 E HCG über 3 - 6 Tage ergab sich dabei ein fast linearer Verlauf der Plasmaentfaltung, deren Maximum mit höherer Dosierung rasch erreicht wurde. Die ebenfalls untersuchten linearen Kernmeßstrecken der Leydigzellen zeigten nur ein sehr geringes Anwachsen. Auf Grund dieser Angaben kann man annehmen, daß auch bei den vorliegenden Untersuchungen die maximale Entfaltung des Kernvolumens der Leydigzellen schon bei einer Dosierung von 40 IE HCG annähernd erreicht wird.

Ein Anhaltspunkt dafür, daß auch die Zahl der Leydigschen Zellen nach HCG-Gabe ansteigen kann, findet sich bei MADDOCK und NELSON (1952), die Hodenbiopsien beim Menschen untersuchten und bei HERZER (1967), der

nach Pregnyl® Gabe (HCG) eine signifikante Erhöhung der Zahl der Leydigzellen feststellte.

Während mit HCG und Testosteron eine Normalisierung der Tubulusdurchmesser auch bei hoher Dosierung nicht erreicht werden konnte, bewirkten 50 bzw. 200 µg FSH, die zusätzlich zu 2,5 mg Testosteron oder 40 IE HCG verabreicht wurden, eine deutliche Annäherung an den Normalwert (Versuchsgruppe 4 und 5). Die Kerne der Leydigzellen verhielten sich entsprechend dem Zusatz von HCG bzw. Testosteron: sie wurden entweder stimuliert oder atrophierten. FSH selbst zeigte keinen Effekt auf die Leydigzellen.

Eine Wirkung von reinem FSH auf die Tubuli semniferi ist in der Literatur umstritten (s. Einleitung). Von v. BERSWORDT-WALLRABE wird sie verneint. Dagegen wird übereinstimmend bestätigt, wie auch die Versuchsgruppen 4 und 5 zeigen, daß FSH zusammen mit ICSH-Aktivität oder Testosteron das Keimepithel optimal stimuliert und es nach Hypophysektomie wieder normalisiert (s. a. WOODS und SIMPSON 1961). Um das Wachstum der Tubuli semniferi anzuregen muß beides vorhanden sein. ICSH bzw. Androgen ist nötig für die günstige intratubuläre Umgebung, FSH für die Entwicklungsstufe der primären Spermatocyten (LOSTROH 1963).

Bei einer Dosissteigerung von 50 auf 200 µg FSH zeigten die bestimmten Tubulusdurchmesser keine signifikante Zunahme. Ähnliches wird von MURPHY (1965 a, b) berichtet. Er injizierte 21 Tage alten hypophysektomierten Ratten 3mal wöchentlich 3 Wochen lang FSH in steigender Dosierung intratestikulär und fand am injizierten und kontralateralen Hoden bei 5 µg FSH pro Tag ein Maximum der Tubulusdurchmesser, das selbst durch das 20fache dieser Dosierung nicht übertroffen wurde. Dagegen läßt sich der Arbeit von v. BERSWORDT-WALLRABE et al. (1968) entnehmen, daß bei einer von 50 auf 500 µg FSH/100 g Körpergewicht und Tag erhöhten Dosierung, die 21 Tage nach der Hypophysektomie verabreicht wurde, der Tubulusdurchmesser um 40 µ zunahm. Es ist aber darauf hinzuweisen, daß v. BERSWORDT-WALLRABE im Gegensatz zu den infantilen Tieren der Gruppen 4 und 5 adulte Ratten mit einem Gewicht von 200 - 260 g verwendete.

Die in der vorliegenden Arbeit histometrisch ausgemessenen Hodenpräparate waren von BLOBEL (1966) auf ihre Gewichtsänderung gegenüber dem bei der Hypophysektomie entfernten anderen Hoden untersucht worden. Vergleicht man die Gewichtsänderung mit dem histometrischen Befund, lassen sich folgende Beziehungen feststellen. Bei der größten Gewichtsabnahme (-40 mg), die bei den hypophysektomierten unbehandelten Kontrolltieren gefunden

wurde, weisen die Präparate die kleinsten Tubulusdurchmesser (85 µ) und atrophische Leydigzellkerne (43 μ^3) auf. Die stärkste Gewichtszunahme zeigen die Hoden der Versuchsgruppe 5 (FSH plus HCG); hier sind Tubulusdurchmesser und Kernvolumen der Leydigzellen maximal stimuliert.

Bei den mit FSH und bzw. oder Testosteron behandelten Tieren mit einem gleichbleibend atrophischen Kernvolumen der Leydigzellen nehmen mit steigendem Hodengewicht von -40 mg bis +35 mg die Tubulusdurchmesser von 85 µ auf 119 µ zu (Versuchsgruppen 1, 3 und 4, Tab. II). Dieser Befund spricht zunächst für die allgemeine Annahme, die z.B. nach TONUTTI (1960) besagt, daß die Verkleinerung des Hodens nach Hypophysektomie allein auf die Abnahme des Kalibers der Samenkanälchen zurückzuführen sei. Der Anteil der Leydigzellen am Hodenvolumen sei so gering, daß deren Atrophie bei der Größenabnahme keine Rolle spiele.

Tab. II: Beziehung zwischen Hodengewicht und Tubulusdurchmesser bei gleichbleibendem Kernvolumen

Vers.-gr.	Hormondosierung		Hodengew.-zunahme[1]	Durchmesser der Tubuli	Kernvolumen Leydigzellen
	FSH	Testo.			
	µg	mg	mg	µ	μ^3
1	-	-	-40,4	85,5	43,2
3	-	2,5	-17,4	105,6	45,7
4	50	2,5	8,8	112,3	48,0
	200	2,5	34,9	119,3	40,3

1) Diese Werte wurden der Arbeit "Über das Choriongonadotropin" BLOBEL (1966) entnommen.

Tab. III: Beziehung zwischen Hodengewicht und Kernvolumen der Leydigzellen bei gleichbleibendem Tubulusdurchmesser

Vers.-gr.	Hormondosierung			Hodengew.-zunahme[1]	Durchmesser der Tubuli	Kernvolumen Leydigzellen
	FSH µg	HCG IE	Testo. mg	mg	µ	μ^3
3	-	-	2,5	-17,4	105,6	45,7
6	-	1600	2,5	17,4	105,3	106,7
4	50	-	2,5	8,8	112,3	48,0
5	50	40	-	29,0	114,8	96,2
4	200	-	2,5	34,9	119,3	40,3
5	200	40	-	49,0	115,3	90,2

1) Diese Werte wurden der Arbeit "Über das Choriongonadotropin" BLOBEL (1966) entnommen.

Vergleicht man die Versuchsgruppen 3 und 6, 4 und 5 oder die Werte in Gruppe 6 miteinander (Tab. III), so sieht man, daß bei gleichbleibendem oder geringfügig abnehmendem Tubulusdurchmesser eine Beziehung zwischen der Zunahme des Hodengewichts und dem Ansteigen des Kernvolumens der Leydigzellen besteht. Das aber würde bedeuten, daß die Hodengewichtszunahme nicht nur auf einem Anwachsen der Tubulusdurchmesser beruht, sondern offenbar auch durch eine Stimulierung der Leydigzellen bedingt ist. Damit ist vermutlich auch die Beobachtung zu erklären, daß beim FSH-Test (BLOBEL 1966 S. 40) die Gewichtszunahme in der Kombination HCG plus FSH ausgeprägter war als bei Testosteronpropionat plus FSH, obwohl der Androgenspiegel, gemessen am Gewicht der ventralen Prostata, geringer gewesen sein muß.
Ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme findet sich bei NEUMANN et al. (1968): "Die Zunahme des Hodengewichts (nach HCG) geht, wie die Histologie eindrucksvoll zeigt, vor allem auf eine starke Stimulierung der Zwischenzellen zurück."

Während bei den bisher genannten Versuchsgruppen parallel zum Ansteigen des Hodengewichts eine Zunahme der Tubulusdurchmesser und bzw. oder des Kernvolumens der Leydigzellen erfolgte, kann dies bei den folgenden nicht festgestellt werden. Mit einer Erhöhung der Dosierung von 50 auf 200 µg FSH

in Versuchsgruppe 4 und 5 steigt das Hodengewicht an, obwohl weder Tubulusdurchmesser noch Kernvolumen der Leydigzellen eine signifikante Größenzunahme zeigen. Ähnliche Ergebnisse finden sich bei MURPHY (1965), der bei steigender FSH-Dosierung trotz Anwachsen des Hodengewichts ab 5 µg FSH täglich keine weitere Vergrößerung der Tubulusdurchmesser fand. Man kann daher vermuten, daß das größere Hodengewicht hier auf einer zahlenmäßigen Zunahme der Tubulusquerschnitte d.h. auf einem Längenwachstum der Samenkanälchen beruht.

Die dosisabhängige Hodengewichtszunahme im FSH-Test nach der Methode von PAESI, WIJNANS und de JONGH (1951) und nach der Methode von BLOBEL (1966) korreliert nicht mit dem Durchmesser der Tubuli semniferi. Diese sind zwar stimuliert, zeigen aber keine weitere Größenzunahme. Eine Korrelation mit der Länge der Tubuli wäre denkbar. Wie oben erwähnt besteht eine deutliche Beziehung zwischen der stärkeren Augmentation des HCG (im Vergleich zu Testosteronpropionat) im FSH-Test und dem Kernvolumen der Leydigzellen. Es ist der Vorteil der Modifikation des FSH-Testes nach BLOBEL, daß nur die Tubulusdurchmesser stimuliert werden und nicht die Leydigzellen.

Bei den Versuchen, die anhand der Gewichtsmessung nach der Methode von BLOBEL bei einer Dosis von 800 - 1600 IE HCG eine "FSH-Aktivität" im HCG ergaben, konnte keine Wirkung auf den Durchmesser der Tubuli semniferi beobachtet werden. Die Hodengewichtszunahme, die zwischen 400 und 1600 IE HCG signifikant ist, korreliert jedoch mit dem Kernvolumen der Leydigzellen, die in diesem Bereich eine signifikante Größenzunahme zeigen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß sich histometrisch kein eindeutiges Korrelat zu den Ergebnissen der Hodengewichtsmessung fand. Es ließ sich eine Korrelation sowohl zum Durchmesser der Tubuli semniferi als auch zum Kernvolumen der Leydigzellen nachweisen und man kann annehmen, daß eine solche auch zur Länge der Samenkanälchen besteht.

V. ZUSAMMENFASSUNG

An 85 Hodenpräparaten von Ratten, deren Gewichtszunahme bzw. -abnahme von BLOBEL (1966) im Rahmen quantitativer FSH-Nachweismethoden untersucht worden war, wurde das Kernvolumen der Leydigzellen und der Durchmesser der Tubuli semniferi histometrisch bestimmt und mit der Hodengewichtsmessung verglichen.

Obwohl FSH und HCG bzw. Testosteronpropionat eine signifikante Größenzunahme der Tubulusdurchmesser gegenüber den unbehandelten hypophysektomierten Tieren bewirkten und HCG die Leydigzellen maximal entfaltete, konnte keine eindeutige Korrelation zum Hodengewicht festgestellt werden.

Es wird vermutet, daß neben einer Zunahme des Tubulusdurchmessers und des Kernvolumens der Leydigzellen auch das Längenwachstum der Samenkanälchen bei der Hodengewichtszunahme eine Rolle spielt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. BATES, R.W. and SCHOOLEY, I.P.: Studies on the assay of pituitary gonadotropins using the augmentation reaction. Endocrinology 31, 309 - 317 (1942).

2. von BERSWORDT-WALLRABE, R., STEINBECK, H. und NEUMANN, F.: Effect of FSH on the testicular structure of rats. Endokrinologie 53, 35 - 42 (1968).

3. BLOBEL, R.: Über das Choriongonadotropin, Untersuchungen zur biologischen Charakterisierung verschiedener Präparationen. Fortschritte der Geburtshilfe und Gynäkologie, Vol. 28 (Bibl. Gynaecologica, Fasc. 40) 101 S (1966).

4. BOCCABELLA, A.V.: Reinitiation and restoration of spermatogenesis with Testosterone Propionate and other hormones after a long term posthypophysectomy regression period. Endocrinology 72, 787 - 798 (1963).

5. BROWN, P.S.: Experimental examination of an assay for urinary follicle stimulating hormone. J. Endocrin. 14, 257 - 262 (1956).

6. BROWN, P.S. and BILLEWICZ, W.Z.: The response of immature mice to mixtures of gonadotrophins. J. Endocrin. 24, 65 - 75 (1962).

7. EVANS, H.M. and SIMPSON, M.E.: Physiology of the gonadotropines. In: PINCUS, G. and THIMAN, K.V.: The Hormones, Vol. 2 (Acad. Press, New York 1950).

8. EVANS, H.M., SIMPSON, M.E., TOLKSDORF, S. and JENSEN, H.: Biological studies of the gonadotrophic principles in sheep pituitary substance. Endocrinology 25, 529 - 546 (1939).

9. FETZER, S., HILLEBRECHT, J., MUSCHKE, H.E. und TONUTTI, E.: Hypophysäre Steuerung der interstitiellen Zellen des Rattenovariums, quantitativ betrachtet am Zellkernvolumen.
Zschr. Zellforschung 43, 404 - 420 (1955).

10. GANS, E. and van REES, G. P.: Studies on the testicular augmentation assay method for follicle stimulating hormone.
Acta Endorin. 52, 573 - 582 (1966).

11. GREEP, R.O., van DYKE, H.B. and CHOW, B.F.: The effect of pituitary gonadotropins on the testicle of hypophysectomized immature rats.
Anat. Record 78, 88 (1940). Zit. nach ZARROW, M.X., YOCHIM, J.M. and Mc CARTHEY, J.L.: Experimental Endocrinology (Acad. Press, New York, London 1964).

12. GREEP, R.O., van DYKE, H.B. and CHOW, B.F.: Use of anterior lobe of prostate gland in the assay of metakentrin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 46, 644 - 649 (1941).

13. GREEP, R.O., van DYKE, H.B. and CHOW, B.F.: Gonadotropins of the swine pituitary. I. Various biological effects of purified thylakentrin (FSH) and pure metakentrin (ICSH).
Endocrinology 31, 635 - 649 (1942)

14. HERCHEN, H.: Quantitative Untersuchungen über die Plasmarückbildung und Plasmaentfaltung der Leydig-Zellen des Rattenhodens in Abhängigkeit vom Grad der Gonadotropinstimulierung.
Endokrinologie 31, 184 - 198 (1954).

15. HERZER, H : Wirkung von Amphenon auf Hodenzwischenzellen der Ratte.
Schw. Med. Wschr. 97, 14 - 19 (1967).

16. IGARASHI, M. and Mc CANN, S.M.: A new sensitive bioassay for FSH.
Endocrinology 74, 440 - 445 (1964).

17. LEMBECK, F. und SEWING, K.-F.: Pharmakologie-Fibel. Tafeln zur Pharmakologievorlesung. Berlin: Springer 1966.

18. LOSTROH, A.J.: Effect of follicle-stimulating hormone and interstitial cell-stimulating hormone on spermatogenesis in Long Evans Rats hypophysectomized for six months. Acta Endocrin. 43, 592 - 600 (1963).

19. MADDOCK, W.O. and NELSON, W.O.: The effects of chorionic gonadotropins in adult men: increased estrogen and 17 Ketosteroid excretion, gynecomastia, Leydig-cell stimulation and seminiferous tubule damage. J. clin. Endocrin. 12, 985 - 1014 (1952).

20. MUSCHKE, H.: Histometrische Untersuchungen am Rattenhoden nach Hypophysektomie und nach Choriongonadotropinzufuhr. Endokrinologie 30, 281 - 293 (1953).

21. MURPHY, H.D.: Sertoli cell stimulation following intratesticular injections of FSH in the hypophysectomized rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 1202 - 1205 (1965).

22. MURPHY, H.D.: Intratesticular assay of follicle-stimulating hormone in hypophysectomized rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 671 - 675 (1965).

23. NEUMANN, F., STEINBECK, H., ELGER, W. und von BERSWORDT-WALLRABE, R.: Hoden-Morphologie und -Funktion unter der Einwirkung von PMS und HCG bei gleichzeitiger Antiandrogen-Behandlung. Acta Endocrin. 57, 639 - 648 (1968).

24. PARLOW, A.F.: A rapid bioassay method for LH and factors stimulating LH secretion. Federation Proceedings 17, 402 (1958).

25. PAESI, F.J.A., WIJNANS, M. and de JONGH, S.E.: The FSH content of the hypophysis as influenced by low concentrations of oestrogen. Acta Endocrin. 8, 251 (1951).

26. PAESI, F.J.A , de JONGH, S.E., HOOGSTRA, M.J. and ENGELBRECHT, A.: The follicle-stimulating hormone content of the hypophysis of the rats as influenced by gonadectomy and oestrogen treatment. Acta Endocrin. (kbh) 19, 49 - 60 (1955).

27. STEELMAN, S.L. and POHLEY, F.M.: Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. Endocrinology 53, 604 - 616 (1953).

28. TONUTTI, E.: Zur Histophysiologie der Leydigschen Zwischenzellen des Rattenhodens. Zschr. Zellforschung 32, 495 - 516 (1943).

29. TONUTTI, E.: Über die Strukturelemente des Hodens und ihr Verhalten unter experimentellen Bedingungen (Hypophysektomie und Substitution mit Choriongonadotropin). In 1. Symposion der Dtsch. Ges. Endokrinologie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955, 146 - 158.

30. TONUTTI, E.: Die männliche Keimdrüse. Struktur, Funktion, Klinik. Grundzüge der Andrologie. Stuttgart: Thieme 1960, 226 S.

31. WALSH, E.L., CUYLER, W.K. and Mc.CULLAGH, D.R.: The physiologic maintenance of the male sex glands. (The effect of Androtin on hypophysectomized rats). Am. Journ. Physiology 107, 508 - 512 (1934).

32. WOODS, M.C. and SIMPSON, M.E.: Pituitary control of the testis of the hypophysectomized rat. Endocrinology 69, 91 - 125 (1961).

Herrn Doz. Dr. R. Blobel möchte ich für die Stellung des Themas und für die Überlassung der bearbeiteten Präparate sowie für seine Unterstützung am Fortgang der Arbeit aufrichtig Dank sagen.

Lebenslauf

Als Tochter des 1943 gefallenen Dr. med. Walter Eisenhart und der Kinderärztin Dr. med. Lore Eisenhart, geb. Zwanger, wurde ich, Dorothea Etzold, geb. Eisenhart, am 2. 10. 1941 in Tübingen geboren. Meine Schulausbildung schloß ich im Februar 1961 mit der Reifeprüfung am Gymnasium Nürtingen ab.

Im Sommer 1961 begann ich mit dem Studium der Medizin in Tübingen. Während der ersten beiden klinischen Semester studierte ich an der Universität in Hamburg. Im August 1967 legte ich das Staatsexamen in Tübingen ab.